临床研究

2例汉族马凡综合征患者的FBN1基因新发突变

魏碧娜[1],陶 敏[2],范雪娇[2],王 韧[3],饶慧英[4],陈喜军[2],黄肖利[2],伍严安[2]
[1]福建省卫生职业技术学院医学技术系,福建 福州 350101;福建医科大学省立临床医学院//福建省立医院,[2]检验科,[3]心血管外科,[4]眼科,福建 福州 350001

摘要:目的 对4例汉族马凡综合征(MFS)患者的原纤蛋白-1(FBN1)基因进行突变筛查,探讨MFS与FBN1基因突变的关系。**方法** 提取4例患者外周血全基因组DNA,应用PCR-DNA测序的方法进行FBN1基因突变筛查和鉴定。**结果** 在2例MFS患者FBN1中均发现FBN1突变。其中1例为错义突变,即第63号外显子7892G>A(Cys2631Tyr);另1例为移码突变,即第50号外显子6258delC,该突变导致提前终止密码子。这两个突变先前均未见报道。**结论** FBN1基因突变可能是这2例MFS患者的致病因素。
关键词:马凡综合征;原纤维蛋白-1;基因突变;DNA测序

Novel FBN1 mutations in 2 Chinese Han patients of Marfan syndrome

WEI Bina[1], TAO Min[2], FAN Xuejiao[2], WANG Ren[3], RAO Huiying[4], CHEN Xijun[2], HUANG Xiaoli[2], WU Yanan[2]
[1]Department of medical technology ,Fujian Health Technical College, Fuzhou 350101, China; [2]Department of Clinical laboratory,[3]Department of Cardiovascular Surgery, [4]Department of Ophthalmology, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University/ Fujian Province Hospital, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To detect FBN1 mutation by screening FBN1 gene from 4 patients with Marfan syndrome(MFS) to investigate the correlation between the gene mutation and the MFS. **Methods** Genomic DNAs were extracted from whole blood sample of the 4 patients. All 65 exons of FBN1 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) followed by Sanger sequencing analysis respectively. **Results** Two mutations of the FBN1 were found in 2 out of the 4 MFS patients respectively. One was a missense mutation of 7892G>A (C2631Y) and the other frame shift mutation of 6258delC, which producing a premature termination condon (PTC). Both of the mutations were not reported previously. **Conclusion** The 2 FBN1 gene mutations are possibly the pathogenesis of the 2 MFS patients.
Key words: Marfan syndrome; fibrillin-1; gene mutation; DNA sequencing

马凡综合征(MFS)是比较罕见的一种遗传性结缔组织病,为常染色体显性遗传,发病率约为1/5000,有约25%的患者无家族史[1]。MFS的临床表现为四肢细长,不匀称,伴有眼、骨骼和心血管等异常。骨骼系统的临床表现主要包括身材瘦高、蜘蛛脚样指(趾)、胸壁畸形(漏斗胸或鸡胸)、脊柱侧凸。眼部的临床表现为晶状体异位。心血管系统的临床表现是主动脉夹层形成与二尖瓣脱垂、主动脉窦部进行性扩张等。主动脉夹层是MFS最严重的并发症,可导致患者死亡。

目前已明确MFS与原纤维蛋白1(Fib-1)基因(FBN1)突变有关。FBN1定位于15q21.1,全长235 kb,含65个外显子,其mRNA含9749个核苷酸。FBN1编码的Fib-1是相对分子质量为320 000的糖蛋白,由2871个氨基酸组成,广泛分布在弹性与非弹性组织中,是细胞外基质中大量存在的微纤维的主要蛋白之一,其结构主要包含3个富含半胱氨酸的重复性的转化生长因子(TGF)、表皮生长因子(EGF)结构域及杂合结构域:(1)类TGF β1结合蛋白结构域是与转化生长因子β1结合蛋白同源,共有7个,该结构域只出现在基质纤维中,共含8个半胱氨酸残基;(2)类EGF结构域,共有47个,其中43个是保守一致序列形成了钙螯合位。该结构域与Ca^{2+}结合可保护Fib-1的球状结构不被蛋白酶水解;(3)杂合结构域,是Fib-1所特有的一种杂交结构域,具有以上两种结构域的特征。这些结构域均具有重要功能[2]。在细胞外基质中,Fib-1与TGFβ信号传导有功能上的相关性,因此FBN1突变将导致TGFβ信号传导异常,将影响微纤维的结构与功能[3]。本研究采用PCR-DNA测序的方法分析汉族MFS患者的FBN1基因突变。

收稿日期:2016-03-05
基金项目:福建省自然科学基金(C0810004);福建省立医院院内重点项目(2014081)
作者简介:魏碧娜,副教授,E-mail: 779067308@qq.com
通信作者:伍严安,教授,主任医师,E-mail: wyaslyy@126.com

1 对象与方法

1.1 研究对象

2012年1~6月就诊于福建省立医院心胸外科,临床

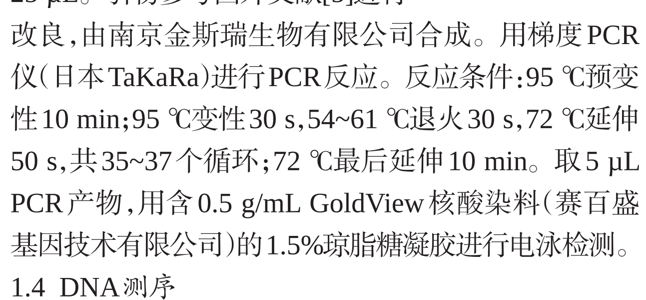
诊断为MFS的患者4例,临床诊断参考2010年全面修正的MFS诊断标准[4]。患者均为汉族,男性2例,女性2例。对检出的错义突变,以50名健康者作为对照,以鉴别是否是SNP。对每例患者均进行较为详细的体格检查,包括骨骼系统,心血管系统和眼等。所有病人均知情同意,并提供外周血样本。

1.2 基因组DNA的抽提

取以上检测对象外周静脉血2 mL,EDTA抗凝,全血DNA抽提试剂盒(天根生物科技有限公司)抽提基因组DNA。

1.3 PCR检测

对FBN1的65个外显子进行PCR扩增,扩增片段包括65个外显子及侧翼内含子。PCR反应体系为10× Ex Taq buffer(Mg^{2+} Plus) 2.5 μL,dNTP1.0 μL(2.5 mmol/L),上下游引物各1.0 μL(10 μmol/L),DNA模板1.0 μL,Ex Taq DNA聚合酶(日本TaKaRa)0.125 μL,终体积25 μL。引物参考国外文献[5]进行改良,由南京金斯瑞生物有限公司合成。用梯度PCR仪(日本TaKaRa)进行PCR反应。反应条件:95 ℃预变性10 min;95 ℃变性30 s,54~61 ℃退火30 s,72 ℃延伸50 s,共35~37个循环;72 ℃最后延伸10 min。取5 μL PCR产物,用含0.5 g/mL GoldView核酸染料(赛百盛基因技术有限公司)的1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测。



1.4 DNA测序

电泳条带清晰的PCR产物由南京金斯瑞生物有限公司用ABI 3730 DNA测序仪(美国Applied Biosystems)进行DNA测序,以确定突变位点及类型,每个突变均再次PCR-DNA测序证实。

2 结果

2.1 PCR产物测序结果

2例患者的PCR-DNA产物测序结果发现突变。1例为1号患者,其第63号外显子c.7892G>A,导致第2631位的半胱氨酸变为酪氨酸(p.Cys2631Tyr),影响第42号cbEGF结构域。该患者有MFS家族史(图1),箭头为先证者。对3名能采集到标本的家系成员进行了该外显子检测,有MFS表现的成员Ⅱ3,Ⅲ6检出同样突变,而表型正常的Ⅱ10未检出突变。50名健康者未检出同样突变。

另1例为4号患者,其第50号外显子c.6258delC,导致第2087位氨基酸处提前出现终止密码子UAA(p.Ala2087AlafsX1),为缺失/框移突变。2例MFS患者FBN1基因测序结果见图2。

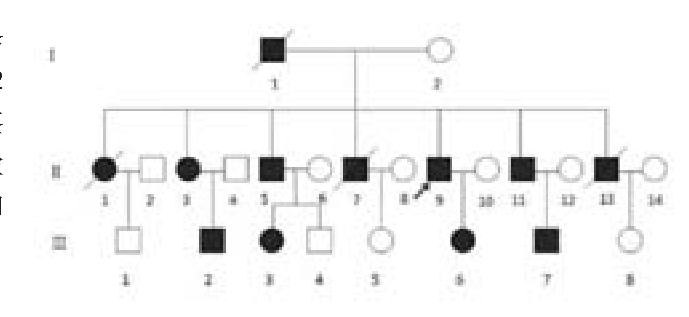
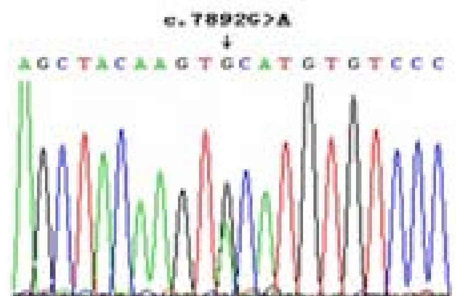


图1 1号MFS患者家谱示意图



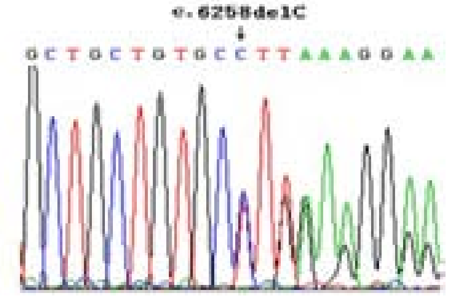


图2 2例MFS患者FBN1基因测序结果

2.2 2例发现FBN1突变患者的临床表现

1号患者,男,57岁,身高175 cm,体质量70 kg,有鸡胸,左右前胸廓不对称,有平足,二维彩超显示主动脉窦部扩张(50.7 mm),主动脉瓣关闭不全伴返流+++至++++,左室内径扩大,二尖瓣关闭不全伴返流++。有MFS家族史(图2)。4号患者,女,28岁,因I型夹层主动脉瘤入院。身高165 cm,体质量55 kg,有蜘蛛样指趾和晶状体半脱位,无MFS家族史。

3 讨论

1991年Dietz等[6]首次提出FBN1突变是MFS的致病原因,至今全球突变数据库(http://www.umd.be/FBN1/)已有上千种FBN1突变的报道。这些突变发生在整个基因的任意区域,没有集中的突变热点。FNB1突变可分为编码区突变和非编码区突变,其中编码区突变占80%以上,主要有碱基置换、移码突变、错义突变、无义突变等[7-8]。本研究在4例患者中发现2例患者携带2种不同的FBN1突变。1例为碱基置换,即为第63号外显子7892G>A(p.Cys2631Tyr),导致错义突变;另1例为移码突变,即第50号外显子6258delC,导致无义突变。经FBN1基因SNP数据库和突变数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=FBN1;http://www.umd.be/FBN1/)检索,两例均未见相同报道,为新发突变。

本研究对象中的1号患者有明确家族史,遗传与性别无明显的相关性,家族中男女均有患病。家系中连续3代均有发病患者,无隔代遗传史。该患者有骨骼系统

和心血管系统表现,无眼部改变,基因检测发现7892G>A(p.Cys2631Tyr),该错义突变导致编码的氨基酸由半胱氨酸变为酪氨酸。半胱氨酸残基的改变,影响第42号cbEGF结构域,使钙螯合部位保守序列残基的结构发生改变,使Fib-1的二级结构发生变化,最终破坏了Fib-1和微纤维蛋白的球状结构,影响其功能[2, 9],是该患者患病的原因。虽然有研究显示半胱氨酸残基置换与晶状体异位相关[10],但也有报道显示二者关系并不密切[11]。本例突变发生在半胱氨酸位,但无晶状体脱位。

据报道,FNB1突变中大多数是错义突变(67%),常位于cbEGF样基序(3/4),它们通过置换半胱氨酸残基(49%),破坏钙结合功能和/或结构域的二级结构;或创造半胱氨酸残基(7.6%),牵累二硫键导致基序的错误折叠。这些突变在蛋白水平上影响Fib-1的运输[12],延迟Fib-1的分泌[13]和增加Fib-1对蛋白酶的敏感性[14]。其它错义突变(1/4)出现在Fib-1的其它基序上,其病理机制还有待阐述。

本研究对象中的4号患者没有家族史,属于散发突变,具有明显的心血管系统、视觉系统和骨骼系统的受累,表现为主动脉根部扩张和主动脉根部至降主动脉形成夹层动脉瘤、晶状体半脱位和蜘蛛样指趾。基因检测发现6258delC,该移码突变使其第2087个密码子突变为终止密码子UAA,翻译提前终止,肽链合成提前终止于2087位氨基酸。肽链合成的提前终止导致Fib-1缺失了与Ca^{2+}结合的结构域,表现为显性负效应,这可能是该患者患病的原因。

据报道,约20%的突变是小片段的缺失和插入导致了框移,约12%的突变是剪接位点突变,两者均可导致Fib-1分子变短,表现为显性负效应。但临床表型变异性高,这是因为临床表型的严重程度直接与突变的mRNA转录量和截短的FBN1比例有关。FBN1非常罕见的突变是FBN1大片段的基因重排,只有少数多个外显子的同时缺失的报道[15]。

FBN1是具有65个外显子的大基因,以前常用的方法是通过DHPLC筛选出可能存在突变的外显子,再经测序验证。由于测序成本逐渐降低,目前多用PCR产物直接测序,更加快捷。本研究也采用了PCR产物直接测序的方法。对于未发现突变的患者不能排除整个外显子缺失突变,需要进一步采用多重连接探针扩增技术检测[8]。但是以上方法都仅检测外显子及其侧翼区。最近报道了在FBN1深部内含子突变伴有一个含终止密码子的假外显子[16],提示对仅检测外显子未发现突变的病例需要进行内含子筛查。

由于MFS患者临床症状表现多样,甚至同一个家族中携带同一致病基因的患者症状也不同,而且很多症状的出现与年龄增长密切相关,许多患者在儿童期并未出现临床症状。此外,MFS还与其它一些疾病存在表型上的交叉,给临床诊断带来一定的困难。因此,许多MFS患者需要基因诊断和临床诊断相结合才能确诊。基因突变检测有助于家系成员的确诊,有利于年幼患者的早诊断早监护早治疗,并能为孕妇进行产前诊断提供分子生物学依据。

参考文献:

[1] Ho NC, Tran JR, Bektas A. Marfan's syndrome[J]. Lancet, 2005, 9(2): 1978-81.

[2] Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, et al. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein[J]. J Biol Chem, 2003, 278(8): 2750-7.

[3] Robinson PN, Booms P, Katzke S, et al. Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies[J]. Hum Mutat, 2002, 20(3): 153-61.

[4] Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome[J]. J Med Genet, 2010, 47(7): 476-85.

[5] Nijbroek G, Sood S, Mcintosh I, et al. Fifteen novel FBN1 mutation causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons[J]. Am J Hum Genet, 1995, 57(1): 8-21.

[6] Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene[J]. Nature, 1991, 352(6333): 337-9.

[7] Yoo EH, Woo H, Ki CS, et al. Clinical and genetic analysis of Korean patients with Marfan syndrome: possible ethnic differences in clinical manifestation[J]. Clin Genet, 2010, 77(2): 177-82.

[8] Downing AK, Knott V, Wemer JM, et al. Solution structure of a pair of calcium binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders[J]. Cell, 1996, 85(8): 597-605.

[9] Ades LC, Holman KJ, Brett MS, et al. Ectopia lentis phenotypes and the FBN1 gene[J]. Am J Med Genet, 2004, 126A(3): 284-9.

[10] Pees C, Michel BI, Hagl M, et al. Detection of 15 novel mutations in 52 children from 40 families with the Marfan or Loeys-Dietz syndrome and phenotype-genotype correlations[J]. Clin Genet, 2014, 86(6): 552-7.

[11] Whiteman P, Handford PA. Defective secretion of recombinant fragments of fibrillin-1: implications of protein misfolding for the pathogenesis of Marfan syndrome and related disorders[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(7): 727-37.

[12] Schrijver I, Liu W, Brenn T, et al. Cysteine substitutions in epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1:distinct effects on biochemical and clinical phenotypes[J]. Am J Hum Genet, 1999, 65(4): 1007-20.

[13] Vollbrandt T, Tiedemann K, El-Hallous E, et al. Consequences of cysteine mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules of fibrillin-1[J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32924-31.

[14] Collod BG, Le BS, Ades L, et al. Update of the UMD- FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphlism database[J]. Hum Mutat, 2003, 22(3): 199-208.

[15] Gillis E, Kempers M, Salemink S, et al. An FBN1 deep intronic mutation in a familial case of marfan syndrome: an explanation for genetically unsolved cases[J]. Hum Mutat, 2014, 35(5): 571-4.